

(4)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-096194

(43)Date of publication of application : 14.04.1989

(51)Int.Cl.

C07K 1/08
C07K 5/06

(21)Application number : 62-253383

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 07.10.1987

(72)Inventor : KATO TOSHIHISA
KURAUCHI MASAHIKO

(54) PRODUCTION OF GLUTAMINE DERIVATIVE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain the titled compound in good yield and high purity, by using unprotected glutamine as glutamine and carrying out a reaction in the presence of a weak base in subjecting C end of an amino acid to peptide binding with N end of the glutamine by an active esterification method.

CONSTITUTION: When C end of amino acid or peptide is subjected to peptide binding with N end of glutamine by an active esterification method, unprotected glutamine is used as glutamine and simultaneously the reaction is carried out in the presence of a weak base such as sodium carbonate to provide the aimed compound. Further more, an amino acid or peptide which is N-protected with a carbobenzoxy group is preferably used as the above-mentioned amino acid or peptide. The above-mentioned reaction is preferably carried out using THF, etc., as a solvent as well as using dicyclohexylcarbodiimide as a condensing agent.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平1-96194

⑤ Int. Cl.⁴
C 07 K 1/08
5/06

識別記号

庁内整理番号
8318-4H
Z-8318-4H

④ 公開 平成1年(1989)4月14日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全3頁)

⑬ 発明の名称 グルタミン誘導体の製造方法

⑭ 特 願 昭62-253383

⑮ 出 願 昭62(1987)10月7日

⑯ 発 明 者 加 藤 敏 久 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

⑯ 発 明 者 倉 内 雅 彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
研究所内

⑰ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

明 細 書

1. 発明の名称

グルタミン誘導体の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. アミノ酸又はペプチドのC端と、グルタミンのN端とで活性エステル化法によりペプチド結合せしめてグルタミン誘導体を製造するに際し、グルタミンが無保護グルタミンであり、ペプチド結合反応が弱塩基の存在下で行われることを特徴とするグルタミン誘導体の製造方法。

2. アミノ酸がグリシン又はアラニンである特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. アミノ酸又はペプチドがN保護されたものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

4. N保護基がカルボベンゾキシ基である特許請求の範囲第3項記載の方法。

5. 弱塩基が炭酸塩又は炭酸水素塩である特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はグルタミンを含むペプチドの合成に関するものである。より詳細には本発明はN-保護アミノ酸又はペプチドをジクロロヘキシルカルボジイミドなどの縮合剤を用いてN-ヒドロキシクシンイミド等と反応させ活性エステルとしこれを無保護グルタミンとペプチド結合反応させこれを脱保護することによりグルタミン含有ペプチドを得る方法に関するものである。

[従来の技術]

グルタミン含有ペプチドは近年無血清培養地の成分として極めて有用であり、また輸液の成分としての利用も進められておりその実用的な重要性は明白である。

従来、グルタミンを含有するペプチドの製造方法においてはそのγ-アミド基の不安定性によりいろいろな副反応を起こすことが知られており(J. Rudinger, Angew. Chem. 71, 742 (1959))合成することが困難であった。以下にグルタミンを含有するペプチドの合成文献をあげる。

① Y. Shimonishi, S. Sakakibara, S. Akabori.

Bull. Chem. Soc. Jap. 35, 1966~1970

② Y. Shimonishi, Bull. Chem. Soc. Jap. 37, 200~203

③ S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Bull. Chem. Soc. Jap. 34, 739

しかしいずれの場合にも工業的製法としてはかなりの困難性を伴う。またさらには最終段階で得た生成物に不純物が混入しておりこれを精製することが難しい。

さらに、収率の点からもアラニルグルタミンの場合、①の方法では5%、③では28%程度の収率しか期待できず、工業的観点からは決して満足のいく方法ではない。

(発明が解決しようとする問題点)

工業的に有利な、グルタミン誘導体の製造方法が望まれている。

(問題を解決するための手段)

本発明者らは、アミノ酸又はペプチドのC端とグルタミンのN端とで活性エステル化法によりペプチド結合せしめてグルタミン誘導体を製造する

クシンイミドとカルボジイミド類、望ましくはジクロヘキシルカルボジイミドと反応させ活性エステルとした後、無保護L-グルタミンと反応させZ-Gly-L-Glnを得る。反応は通常30~200℃で行い反応時間は1~30時間であり、望ましくは5~10時間である。得られたZ-Gly-L-Glnはアルコール類望ましくは、メタノール、エタノールと水の混合溶媒中でパラジウム炭素を触媒として水素で脱保護する。反応は通常10~40℃望ましくは15~30℃、反応時間は1~5時間望ましくは1~3時間である。このパラジウム炭素を触媒として用いて水素で脱保護する方法は副反応が起こりにくく、グルタミンを含有するペプチド類の製造においてもすぐれた方法である。

反応の進行はTLC(薄層クロマトグラフィー)により追跡することができる。終了を確認した後触媒を伊過し、反応液にアルコール類望ましくはイソプロパノール、エタノールを加えることにより容易に高純度の目的物を晶析することができる。さらに収率の点からも例えばアラニルグルタミン

に際し、グルタミンが無保護グルタミンであり、ペプチド結合反応を弱塩基の存在下で行なうことによりグルタミン誘導体が収率良くかつ高純度で得られることを見出しこの知見に基づいて本発明を完結するに至った。

アミノ酸又はペプチドはN保護されたものが望ましく、保護基はカルボベンゾキシ基、第三ブチルオキシカルボニル基、ベンジル基等通常用いられるものであればその種類を問わないが、晶析が容易である点から、カルボベンゾキシ基が最も好ましい。また、弱塩基としては炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなどの炭酸塩、炭酸水素塩を用いる。尚、本発明に用いるアミノ酸はD-体、L-体およびDL-体のいずれであってもよい。

本発明の方法によれば、例えばGly-L-Glnを製造する場合、Z-Glyを水溶性の溶媒、たとえばジオキサソラン、テトラヒドロフラン、アセトン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド中で望ましくはジオキサソラン、テトラヒドロフラン中で、N-ヒドロキシベンズトリアゾール、N-ヒドロキシス

の場合、従来法では高々30%程度であったのに対し、本方法では58%の収率が得られ、純度ならびに収率の点から皆つても、従来法にない秀れた製造方法である。

本明細書において使用される略称、略号の意味は次の通りである。

Ala アラニン

Gln グルタミン

Gly グリシン

Z カルボベンゾキシ-~~基~~

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳しく説明する。

実施例1

L-アラニル-L-グルタミンの合成

(a) N-カルボベンゾキシ-L-アラニル-L-グルタミン(Z-L-Ala-L-Gln)

300 mlの丸底フラスコにZ-L-Ala 10 g (44.8ミリモル)とN-ヒドロシクシンイミド5.2 g (45.2ミリモル)を仕込みジオキサソラン100 mlで溶解した。溶液の温度を25~20℃

特開平1-96194 (3)

に供ち、ジシクロヘキシルカルボジイミド 9.2 g (44.7ミリモル) のジオキササン 40 ml 溶液を滴下した。5時間反応させた後生成したジシクロヘキシル炭素を伊別した。一方、L-Gln 7.2 g (50ミリモル) を 10% 炭酸水素ナトリウム水溶液 70 ml に溶解し 15~10℃ に冷却し、この溶液に先のジオキササン溶液を滴下し 5時間反応させた。反応終了後 1N 塩酸で pH を 6.8 に調整しジオキササンを留去した。不溶物を伊過した後 1N HCl で pH を 3~3.5 に調整後 1~2分後に結晶が析出した。これを伊取した後、水洗ついで減圧乾燥すると Z-L-Ala-L-Gln 7 g (20ミリモル) が得られた。さらに先の母液を 1N 塩酸で pH 2.0 に調整し晶析することにより 5 g の Z-L-Ala-L-Gln を得た。

- (b) L-アラニン-L-グルタミン (L-Ala-L-Gln) 200 ml の 3 つ口フラスコに Z-L-Ala-L-Gln 5.0 g (14.2ミリモル) を仕込み 70 ml メタノール水 (メタノール: 水 = 7:3) 100 ml に溶解しマグネッスターラーでかくはんした。

300 ml の丸底フラスコに Z-Gly 10 g (47.8ミリモル) と N-ヒドロキシスチンイミド 5.5 g (47.8ミリモル) を仕込みジオキササン 100 ml で溶解した。溶液の温度を 25~20℃ に保ち、ジシクロヘキシルカルボジイミド 9.9 g (48.0ミリモル) のジオキササン溶液 40 ml を滴下した。

4時間後生成したジシクロヘキシル炭素を伊別した。一方 L-Gln 7.2 g (50ミリモル) を 10% 炭酸水素ナトリウム水溶液 70 ml に溶解し 15℃ に冷却した。これに先のジオキササン溶液を滴下し 15℃ で 5時間反応させた。反応終了後 1N 塩酸で pH を 7.0 に調整しジオキササンを減圧留去した。不溶物を伊過した後 1N 塩酸で pH を 2.0 に調整し一夜冷蔵庫に放置した。析出した結晶を伊取した後水洗ついで減圧乾燥すると Z-Gly-L-Gln 13.2 g (39.2ミリモル) が得られた。

- (b) グリシル-L-グルタミン (Gly-L-Gln) 200 ml の 3 つ口フラスコに Z-Gly-L-Gln

フラスコ内を炭素置換した後 2 重置パラジウム炭素 0.8 g を加え水素気流中で脱保護を行った。2時間後 TLC (薄層クロマトグラフィー) で反応終了を確認しパラジウム炭素を伊過した後、伊液を 20 ml まで減圧濃縮する。これにイソプロピルアルコール 40 ml を加え、30分ほど攪拌を続けると結晶が析出した。これを伊取した後、イソプロピルアルコールで洗浄しついで減圧乾燥すると L-Ala-L-Gln 2.8 g (12.9ミリモル) (90%) が得られた。

mp. 205~207℃ (分解)

$[\alpha]_D^{20} +10.5^\circ$ (C=2.0 H₂O)

IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$ 3400, 3350, 1640, 1630, 1600, 1520, 1380, 1150

Rf 0.20 (シリカゲル、フェノール: 水 = 3:1)

実施例 2

グリシル-L-グルタミンの合成

- (a) N-カルボベンゾキシ-グリシル-L-グルタミン (Z-Gly-L-Gln)

10 g (29.7ミリモル) を仕込み 70 ml メタノール水 100 ml を加えてスターラーで攪拌した。フラスコ内を炭素置換した後 2 重置パラジウム炭素 1.5 g を加え水素気流中で脱保護を行った。反応の当初はスラリー状であるが反応が進行するに従って原料の Z-Gly-L-Gln は溶解した。3時間後 TLC (薄層クロマトグラフィー) で反応終了を確認した後パラジウム炭素を伊過した。伊液を 30 ml まで減圧濃縮した後、メタノール 40 ml を加え、5℃ で一夜晶析した。これを伊取した後、少量の冷メタノールで洗浄しついで減圧乾燥すると Gly-L-Gln·H₂O 4.9 g (22.2ミリモル) (75%) が得られた。

mp. 198℃ (分解)

$[\alpha]_D^{20} -1.6^\circ$ (C=4.0 H₂O)

IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} \text{cm}^{-1}$ 3520, 3400, 3250, 3100, 1690, 1570, 1410, 1340, 1280

Rf 0.13 (シリカゲル、フェノール: 水 = 3:1)

特許出願人 味の素株式会社